

## 明細書

## FALSの臨床悪性度の判定方法

## 技術分野

[0001] 本発明は、NEDL1およびその関連因子と、SOD1変異体との相互作用に基づく、FALSの判定方法、或いは治療薬(方法)に関する。

## 背景技術

[0002] 筋萎縮性側索硬化症(ALS)は、脊椎、運動皮質、脳幹の運動ニューロンの変性、脱落により筋萎縮を生じる、予後不良の神経変性疾患である。現在、家族性のALS(familial lateral sclerosis:以下、FALSという)は、ALS全体の5~10%の頻度で認められるが、その一部の家系で原因遺伝子が、CU/Znスーパーオキシドジスムターゼ(SOD1)遺伝子であることが判明しており、FALS全体の約20%がSOD1遺伝子変異を原因としている。SOD1は、好気性代謝の過程で細胞内に生じる活性酵素の一種であり、スーパーオキシドを不活性化する。近年、変異型SOD1(以下、SOD1変異体という)が細胞内で凝集体を形成し、細胞毒性を発揮するという凝集体仮説がFALSの病因として最も有力なものとされつつある(非特許文献1)。

[0003] 本発明者らは、以前予後良好な神経芽腫と予後不良な神経芽腫との比較において、予後良好な神経芽腫で発現が増強されているNEDL1と命名した新規なHECT型ユビキチンライゲースを見出した(特許文献1)。さらに、NEDL1はSOD1変異体をユビキチン化することも見出した。

[0004] SOD1変異体の細胞内情報伝達経路については、不明な部分が多いがSOD1変異体のみと結合し、正常SOD1(野生型SOD1)とは結合しない蛋白因子として、小胞体トランスロコン成分であるTRAP  $\delta$  (translocon-associated protein complex)が報告されている(非特許文献2、非特許文献3)。

[0005] このようにFALSの原因遺伝子であるSOD1変異体とその関連分子との間の相互作用については、解明されつつあるが、FALSの病理発生については、前記凝集体仮説が正しいとしてもそのメカニズムの全容の解明には程遠い現状である。

特許文献1:国際公開WO 03/018842パンフレット

非特許文献1:中野亮一、細胞工学、第20巻、第11号、1508-1512、2001

非特許文献2:Ryen D. Fons, et al, The Journak of Cell Biology, Vol. 160, No. 4, 2003 (529-539)

非特許文献3:Kunst C.B., et al, Nat. Genet. 15, 91-94 (1997)

## 発明の開示

### 発明が解決しようとする課題

[0006] SOD1変異体とその関連分子との間の相互作用におけるNEDL1の役割について明らかにし、FALSの発症メカニズムの凝集体仮説を検証する。その過程において、各種分子間の結合、相互作用を評価すると、FALSの治療・診断につながる知見が得られる可能性がある。

[0007] 本発明は、SOD1変異体とその関連分子との結合、相互作用 (NEDL1が介在するか、または介在しない)を遺伝子または蛋白レベルで解明することを1つの目的とする。さらに、本発明は、そこで得られた知見を臨床に応用すること、すなわちFALSの新たな治療剤(方法)、診断薬(方法)を提供することを別の目的とする。

### 課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、NEDL1がTRAP δ とが結合し、さらにこれらはSOD1変異体と複合体を形成して、該複合体における結合強度はFALSの臨床悪性度とほぼ比例することを見出した。さらに、同様にNEDL1がDishevel1(以下、Dvl1という)と結合し、さらにこれらはSOD1変異体と複合体を形成して、該複合体における結合強度はFALSの臨床悪性度とほぼ比例することを見出した。また、NEDL1とSOD1変異体との相互作用もFALSの臨床悪性度とほぼ比例することを見出した。

[0009] 特定的には、FALS患者由来の被検体からSOD1変異体を単離し、該SOD1変異体とTRAP δ との結合能を評価することを特徴とする、FALSの臨床悪性度の判定方法が提供される。

[0010] また、FALS患者由来の被検体からSOD1変異体を単離し、該SOD1変異体とNEDL1およびDvl1との結合能を評価することを特徴とする、FALSの臨床悪性度の判定方法も提供される。

[0011] また、FALS患者由来の被検体からSOD1変異体を単離し、該SOD1変異体と

NEDL1との結合能を評価することを特徴とする、FALSの臨床悪性度の判定方法も提供される。

[0012] 要するに、本発明はFALSの臨床悪性度の判定におけるNEDL1またはその基質の使用を提供する。具体的には、その判定において、単離SOD1変異体を用いることを特徴とする。ここで、好ましくは前記基質は、TRAP  $\delta$  またはDvl1である。

[0013] くわえて、SOD変異体とNEDL1および／またはその基質との相互作用における阻害剤が提供される。

[0014] 好ましくは、前記基質がTRAP  $\delta$  またはDvl1である。

[0015] また、神経細胞において、候補薬剤がSOD変異体とNEDL1および／またはその基質との相互作用における阻害剤であるか否かを決定することを特徴とする、FALSの治療において有用な薬剤をスクリーニングする方法も提供される。

### 発明の効果

[0016] 本発明に従えば、FALSの原因遺伝子であるSOD1変異体とその関連分子(TRAP  $\delta$ 、Dvl1等)との間にNEDL1が介在して、複合体が形成されることが明らかとなり、FALSの発症メカニズムとしての凝集体説が確かめられた。さらに、このような複合体におけるSOD1変異体と前記分子との結合能(NEDL1を介するか、介さないかして)がFALSの臨床悪性度に関連しているので、該結合能を評価することによって、FALSの臨床悪性度を判定することができる。

[0017] また、上記の凝集体の形成を阻止することができれば、FALSの治療に繋がる。したがって、本発明に従えば、FALSの治療に有用であろう、SOD変異体とNEDL1および／またはその基質との相互作用における阻害剤が見出される。

### 図面の簡単な説明

[0018] [図1]図1は、ヒトNEDL1(hNEDL1)とマウスNEDL1(mNEDL1)との間の保存的アミノ酸配列のアライメントを示す図である。図中、右欄番号は、イニシエーターであるメチオニンからの塩基数を表す。C2ドメイン、WWドメインおよびHECTドメインがそれぞれ示されている。

[図2]NEDL1とTRAP-  $\delta$  との結合を示す免疫プロットした電気泳動図(免疫プロット図)である。

[図3]NEDL1と内因性TRAP- $\delta$ との結合を示す免疫プロットした電気泳動図である。

[図4]NEDL1とSOD1変異体との結合を示す免疫プロット図である。

[図5]NEDL1の野生型SOD1およびSOD1変異体に対するユビキチン化を示す免疫プロット図である。

[図6]NEDL1の存在下、SOD1変異体および野生型SOD1の分解の経時変化を示す免疫プロット図である。

[図7]SOD1変異体と外因性TRAP  $\delta$ との結合を示す免疫プロット図である。

[図8]NEDL1とDvl1との結合を示す免疫プロット図である。

[図9]NEDL1のDvl1に対するユビキチン化を示す免疫プロット図である。

[図10]NEDL1の存在下、Dvl1の分解の経時変化を示す免疫プロット図である。

[図11]NEDL1の存在下、SOD1変異体とDvl1との結合を示す免疫プロット図である。

[図12]FALS病理発生におけるSOD1変異体とその関連分子との間の相互作用の模式図を示す。

### 発明を実施するための最良の形態

[0019] 以下、本発明について、好適な実施の形態を参照して、詳細に説明する。

[0020] 本発明に係るNEDL1遺伝子は、全長6200塩基(コード領域4755塩基)を有する遺伝子であり、その塩基配列を配列表の配列番号2に示す。該遺伝子がコードするNEDL1タンパク質は、1585個のアミノ酸からなり、その全長を配列表の配列番号1に示す。なお、前記塩基配列およびアミノ酸配列は、GeneBank(  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)に受理番号AB048365として登録されている。

[0021] 図1にヒトNEDL1(hNEDL1)とマウスNEDL1(mNEDL1)のアライメント(ホモロジー解析)を示す。NEDL-1タンパク質は、HECT型ユビキチリガーゼの特徴である以下のドメインを有することが分かる。すなわち、(1)N末端にC2ドメイン(カルシウム依存的に膜脂質に結合する)、(2)中央部にWWドメイン(プロリンリッチ領域との結合に関与)、(3)C末端領域にHECTドメイン(ユビキチン結合酵素E2の結合部位)である。

[0022] NEDL1の基質を同定するために、本発明者らは、前記WWドメイン(757-1114位)を用いて、yeast two hybridスクリーニングを行った。その結果、1つの基質としてTRAP  $\delta$  が見出された。

[0023] TRAP δ は、小胞体膜を横切るタンパク質のトランスポーテーションに関連する因子である、トランスポコン(translocon-associated protein)複合体の構成タンパク質の1つのサブユニットである。TRAP δ が野生型SODとは結合しないが、SOD1変異体と結合することは既に報告されている(Kunst C.B. ら、前掲)。そこで、本発明者らは、NEDL1、TRAP δ 、およびSOD1間の相互作用を調べた。具体的には、COS7細胞をこれらの発現構築物で共トランسفェクトし、免疫プロットおよび免疫沈降アッセイによって、解析した。

[0024] NEDL1とTRAP δとの結合

上記の解析の結果、図2、3に示すように、NEDL1は、内因性および外因性のTRAP δ と結合していることが確認される。この結合は、yeast two-hybridスクリーニングでも前記WWドメインを介していることが確認される。しかし、TRAP δ は、NEDL1によってユビキチン化されない。

[0025] NEDL1とSOD1との結合

上記の解析の結果、図4に示すように、NEDL1は、SOD1変異体と結合するが、野生型SOD1とは結合しないことが確認される。また、NEDL1と様々なSOD1変異体との結合能は、SOD1変異体が単離されたFALS患者の臨床悪性度とほぼ比例することが分かる。

[0026] くわえて、NEDL1がSOD1変異体をユビキチン化することが確認され(図5)、そのユビキチン化の程度は、SOD1変異体が単離されたFALS患者の臨床悪性度とほぼ比例することが分かる。

[0027] NEDL1の存在下、SOD1変異体の分解の経時変化を示したものが、図6であるが、ここでも臨床悪性度に比例して、SOD1変異体が分解していることが分かる。

[0028] これらの結果から、SOD1変異体のユビキチン化を経由する分解には、NEDL1が介在し、臨床悪性度に比例して、分解が進行することが示される。

[0029] TRAP δ とSOD1との結合

上記の解析の結果、図7に示すように、外因性TRAP δ は、SOD1変異体と結合するが、野生型SOD1とは結合しないことが確認される。また、NEDL1の場合と同様に、TRAP δ と様々なSOD1変異体との結合能は、SOD1変異体が単離されたFALS患者

の臨床悪性度とほぼ比例することが分かる。

[0030] 以上の結果および他の研究結果を総合して、FALSの病理発生におけるNEDL1の役割として、(1)NEDL1は、単独でまたはTRAP  $\delta$ と共にSOD1変異体をユビキチン化する(2)NEDL1とTRAP  $\delta$ は、SOD1変異体と凝集体を形成し、これがゴルジ装置の断片化を誘起、ニューロンのアポトーシスをもたらす(3)凝集体の形成は、NEDL1および／またはTRAP  $\delta$ の機能不全を引き起こし、それが運動ニューロン死に結びつく疾患となる(4)NEDL1／TRAP-  $\delta$ ／SOD1変異体の凝集体は、その正常な機能が運動ニューロンの生存に重要である分子シャペロンのような因子を取り込み、不活性化する、などであろう。

[0031] 次いで、ユビキチン化依存性蛋白分解時のNEDL1の基質を同定するために、本発明者らは、NEDL1のWWドメインを含む別のドメイン(382-1448位)を用いて、yeast two hybridスクリーニングを行った。その結果、Dvl1が基質として同定された。

[0032] ヒトDvl1は、670個のアミノ酸からなるタンパク質で、以下のドメインを有する。すなわち、(1)カノニカルWnt/TCFシグナリングに必要とされるDIXドメイン、(2)PDZドメイン(Stbm、CKI結合の標的)、(3)DEPドメイン(PCPシグナリング中の膜局在化に関与)である(D.J. Sussman et al., Dev. Biol. 166, 73-86 (1994); A. Wodarz et al., Cell Dev. Biol. 14, 59-88 (1998); M. Boutros et al., Cell, 94, 109-118 (1998))であり、DEPドメインとNEDL1のWWドメインが結合するものと考えられる。

[0033] TRAP  $\delta$ の場合と同様に、NEDL1、Dvl1およびSOD1間の相互作用を調べた。具体的には、COS7細胞をこれらの発現構築物で共トランスフェクトし、免疫プロットおよび免疫沈降アッセイによって、解析した。

[0034] NEDL1とDvl1との結合  
上記の解析の結果、図8に示すように、NEDL1は、Dvl1と結合していることが確認される。また、NEDL1は、Dvl1をユビキチン化することが確認され、(図9)さらにNEDL1の存在下、Dvl1の分解の経時変化を示したものが図10である。

[0035] Dvl1とSOD1との結合  
上記の解析の結果、図11に示すように、Dvl1は、SOD1とNEDL1の存在下結合することが確認される。また、Dvl1と様々なSOD1変異体との結合能は、SOD1変異体が単

離されたFALS患者の臨床悪性度とほぼ比例することが分かる。

[0036] ALS患者の運動ニューロンで細胞骨格異常が報告されており、NEDL1介在Dvl1分解に対する前記のSOD1変異体の影響が運動ニューロン死に関与していることは可能である(Luo, Z.G. et al., *Neuron* 35, 489-505(2002))。

[0037] 結論

神経細胞E3ユビキチンリガーゼであるNEDL1は、TRAP  $\delta$  と結合(相互作用)するが、Dvl1とも結合し、これをユビキチン化して分解する。NEDL1は、このようにSOD1変異体、Dvl1、TRAP  $\delta$  と複合体を形成するので、特にユビキチン介在の分解を逃れたSOD1変異体と巨大な凝集体を形成する。標的タンパク質(基質)であるDvl1またはTRAP  $\delta$  の活性に影響を与えるNEDL1の機能は、SOD1変異体によって調節される。これら個々の相互作用がすべて、FALSの病理発生に関係しているようである。したがって、前記複合体もしくは巨大凝集体形成の分子メカニズムの解明は、ALSにおける運動ニューロン死を説明し、ひいてはALSに対する新たな治療薬・治療方法の展望を開くことになる。図12に、本発明において得られた知見に基づく、FALS病理発生におけるSOD1変異体とその関連分子との間の相互作用の模式図を示す。

[0038] FALSの治療剤および治療方法

上記のような考察に基づいて、本発明によれば、SOD1変異体とNEDL1および/またはその基質との相互作用における阻害剤の開発が提供される。阻害剤としての候補薬剤は、核酸、タンパク質、低分子化合物(化学合成または天然由来)、タンパク質以外の高分子化合物などである。

[0039] このような阻害剤のスクリーニング方法としては、Two-Hybrid System(例えば、Gyuris, J. *Cell*, 1993, 75, 791-803; Golemis, E. A., *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, Inc.) 1996, Ch. 20.0-20.1)が挙げられる。また、免疫学的手法で、阻害剤のスクリーニング法を実施することもできる。具体的には、細胞(神経細胞)内でSOD1変異体(特に、臨床悪性度の高いもの)とNEDL1および/またはその基質を発現させ、一定時間候補薬剤と共に培養した後、細胞を粉碎して細胞溶解液を調製する。一方の分子に対する抗体で免疫沈降させ、沈殿中に含まれる他方の分子(それ以外)を免疫学的手法(免疫プロット等)で検出ないし、定量することで、

候補薬剤の各分子の相互作用に及ぼす影響を検出できる。ここで、上記培養系に適当なアゴニストと候補薬剤とを同時に添加して、上記アッセイを行い、候補薬剤を含まない細胞からの免疫沈降物と比較することで阻害剤のスクリーニングが可能である。

[0040] 上記のスクリーニング方法で同定されたSOD1変異体とNEDL1および／またはその基質における阻害剤であるタンパク質等は、FALSを患う患者またはその可能性のある患者に経口的に、または非経口的に投与する。この目的で、そのタンパク質を薬学的組成物として調製する。これは、有効量の該結合阻害を薬学的に許容される担体、もしくは希釈剤と混合して、適当な剤形とする。投与に適した剤形は、錠剤、丸剤、散剤、液剤、懸濁剤、乳剤、カプセル剤、坐剤、注射剤等である。

### 実施例

[0041] (方法)

#### (ヒトNEDL1 cDNAのクローニング)

ヒトNEDL1 cDNAのクローニングについては、国際公開WO 03/018842パンフレット(PCT/JP02/08524)に詳述してあるが、本発明では、以下のようにして、実施した。すなわち、フォワード・プライマー(5'-GGTTTTAGGCCTGGCCGCC-3'、配列番号3)およびリバース・プライマー(5'-CAATGAGGTACATGCCAATCC-3'、配列番号4)を使用し、ヒト胎児脳(Stratagene社製)をテンプレートとして、NEDL1cDNA(ヒト神経芽細胞種からのcDNAライブラリー)の5'部分を増幅した。全長ヒトNEDL1 cDNAは、PCR増幅断片(ヌクレオチド1位(翻訳開始部位)～68位)とKIAA0322 cDNA((財)かずさDNA研究所、T.Nagase氏より寄贈)と融合させて、作成した。

[0042] (細胞培養およびトランスフェクション)

細胞は、10%熱不活性化ウシ胎児血清(FBS、Life Technologies, Inc.)、ペニシリン(100IU/ml)、 streptomyces(100 μg/ml)を添加したRPMI1640培地で増殖した。COS7およびNeuro2a細胞は、10%熱不活性化ウシ胎児血清とペニシリン(100IU/ml)／streptomyces(100 μg/ml)を添加したダルベッコ変法イーグル培地(Dulbecco's modified Eagle medium: DMEM)に維持した。細胞は、空气中水飽和5%炭酸ガス雰囲気下、37°Cで培養し。各発現プラスミドの共トランスフェクションは、製造者の指

示書に従い、リポフェクトアミン(LipofectAMINE、Life Technologies, Inc.社製)を用いて実施した。ある種の実験では、トランスフェクトした細胞をMG-132を用いて、終濃度40  $\mu$  Mで30分間処理した。

[0043] (Yeast Two-Hybrid Screening)

スクリーニングは、ヒト胎児脳(1次スクリーニング)およびヒト成人脳(2次スクリーニング)から得られたcDNAライブラリーを用いる、Gal4-based matchmaker two-hybrid system(Clontech社製)を使用して実行した。Saccharomyces cereviciae CG1945細胞をpAS2-1-NEDL1-1(757-1114位、1次スクリーニング)またはpAS2-1-NEDL1-2(382-1448位、2次スクリーニング)で形質転換した。これらの発現ベクターは共にLacZの転写のみを活性化しない。形質転換体をさらに前記cDNAライブラリーで形質転換した。LacZ陽性コロニーを選択した。これら陽性コロニーからプラスミドDNAを抽出して、その核酸配列を決定した。

[0044] (インビトロユビキチン化アッセイ)

インビトロユビキチン化アッセイは、以下のように実施した。0.5  $\mu$  gの精製GST融合蛋白、0.25  $\mu$  g酵母E1(Boston Biochem社製)、E2sを発現するE. coliからの粗細胞溶解物1  $\mu$  lおよび10  $\mu$  gウシUb(Sigma社製)を250 mM Tris-HCl(pH7.6)、1.2 M NaCl、50 mM ATP、10 mM MgCl<sub>2</sub>、および30 mM ジチオスレイトール中でインキュベートした。30°Cで2時間後、SDSサンプルバッファを添加して、反応を停止した。試料をSDS-PAGEで分析し、メンブランに移し、抗ユビキチンモノクローナル抗体(Medical Biological Laboratories社製)で免疫プロットした。

[0045] (発現構築物)

ヘマグルチニンタグおよび(His6)タグされたユビキチンの哺乳動物用発現プラスミドは、D. Bohmann氏より寄贈された。全長NEDL1 cDNAを哺乳動物用発現プラスミドpEF1/His (Invitrogen社製)またはpIRESpuro2 (Clontech社製)に導入した。野生型または変異型のSOD1をコードするcDNAをFLAGもしくはMycエピトープタグ配列のカルボキシ末端に接合し、pIRESpuro2にサブクロニーニングした。同様に、FLAGもしくはMycエピトープタグをTRAP  $\delta$  のカルボキシ末端に接合した。さらに、FLAGもしくはMycエピトープタグをDvl1のアミノ末端に接合した。コード配列は、自動DNA塩基配

列決定によって確認した。

[0046] (免疫沈降およびウエスタンプロット分析)

ウサギでNEDL1オリゴペプチド(460-482位)とTRAP δオリゴペプチド(93-126位)に対して、それぞれ抗NEDL1抗体と抗TRAP δ抗体を作成した。免疫沈降実験では、COS7細胞またはNeuro2a細胞を様々な組合せで、発現プラスミドを用いて共トランスクレクトした。48時間後、プロテアーゼ阻害剤カクテル(Sigma社製)を追加したTNEバッファ(10 mM Tris-HCl pH7.8、150 mM NaCl、1% NP-40、1 mM EDTA、1 mM PMSF)中で細胞溶解した。全細胞溶解物を抗NEDL1抗体、抗FLAG抗体(M2、Sigma社製)または抗Myc抗体(9B11、Cell Signaling Technology社製)を用いて、免疫沈降させた。免疫複合体をGTP結合タンパク質セファロースビーズ上で回収し、Laemmliサンプルバッファ中で沸騰させて溶出し、SDSポリアミドゲルで電気泳動し、エレクトロプロットによりポリビニリデンジフルオリドメンブレン(Immobilon、Millipore社製)に移した。ユビキチン化実験では、細胞溶解をRIPAバッファ(10 mM Tris-HCl pH7.4、150 mM NaCl、1% NP-40、0.1% デオキシコール酸ナトリウム、0.1% SDS、1 mM EDTA)中で実施し、その後強力な超音波処理を行った。メンブレンを第1抗体でプローブし、それからホースラディッシュペルオキシダーゼ(Jackson Immuno Research Laboratories/Southern Biotechnology Associates, Inc.製)で標識した二次抗体とともにインキュベートした。免疫反応性のバンドをECL増強化学発光法(Amersham Pharmacia Biotech社)によって検出した。タンパク質分解実験では、Neuro2細胞を所定の発現プラスミドでトランスクレクトした。トランスクレクションの48時間後、細胞をシクロヘキシミド(Sigma社製)の50 μg/ml濃度で所定時間処理した。その後、全細胞溶解物の等量(50 μg)をウエスタンプロットにかけ、続いてIntelligent Quantifier software(Bio Image社製)を用いて、定量した。

[0047] (実施例1) NEDL1とTRAP δとの結合

COS7細胞を図2に示した発現プラスミド(NEDL1およびFLAG-TRAP δ)で共トランスクレクトした。全細胞溶解物を抗FLAG抗体(第1パネル)または抗NEDL1抗体(第2パネル)で免疫沈降(IP)させた。免疫沈降物を図に示した抗体を用いて免疫プロット(IB)した。全細胞溶解物を各タンパク質の発現レベルについて、免疫プロット解析し

た(第3パネル、第4パネル)。検出は、ホースラディッシュペルオキシダーゼ共役された二次抗体を用いて行った。COS7細胞をxpress-NEDL1発現プラスミドでトランスフェクトし、同様の実験を行った(図3)。これらの結果から、NEDL1とTRAP δとの結合が外因性TRAP δについて確認された。

[0048] (実施例2) NEDL1とSOD1変異体との結合

NEDL1およびFLAGタグSOD1変異体または野生型SOD1を過剰発現するCOS7細胞からの全細胞溶解物を抗FLAG抗体(第1パネル)または抗NEDL1抗体(第2パネル)を用いて、免疫沈降させ、それから抗NEDL1抗体または抗FLAG抗体を用いて、免疫プロットした。NEDL1またはFLAGタグSOD1変異体の発現を抗NEDL1抗体(第3パネル)または抗FLAG抗体(第4パネル)を用いて、それぞれ解析した(図4)。発症後、急速な臨床経過を辿り、患者が1.5年以内に死亡するSOD1変異体(C6F、A4V)は、NEDL1と強く結合していることが分かる(図4、レーン3、4)。一方、発症後緩徐な臨床経過を示す、SOD1変異体(L126S、H46R、D90A)は、ほとんどNEDL1と結合をしていないことが分かる(図4、レーン11～13)。発症後特異な神経症状を示す変異である、SOD1変異体(G93A)は、NEDL1と中程度の結合をしていることが分かる。また、野生型SOD1とNEDL1は結合しない(共沈しない)ことも分かる(レーン2)。

[0049] (実施例3) TRAP δとSOD1変異体との結合

COS7細胞をFLAGタグTRAP δおよびMycタグSOD1変異体またはMycタグ野生型SOD1をコードする発現プラスミドで一過的に共トランスフェクトした。全細胞溶解物を抗Myc抗体(第1パネル)または抗FLAG抗体(第2パネル)を用いて、免疫沈降させ、それから抗FLAG抗体または抗Myc抗体を用いて、免疫プロットした(図7)。FLAGタグTRAP δまたはMycタグSOD1変異体の発現を抗FLAG抗体(第3パネル)または抗Myc抗体(第4パネル)を用いて、それぞれ解析した。発症後、急速な臨床経過を辿り、患者が1.5年以内に死亡するSOD1変異体(A4V)は、TRAP δと強く結合していることが分かる(図7、レーン4)。一方、発症後緩徐な臨床経過を示す、SOD1変異体(H46R)は、ほとんどTRAP δと結合をしていないことが分かる(レーン6)。また、野生型SOD1とTRAP δは結合しない(共沈しない)ことも分かる(レーン3)。

[0050] (実施例4) NEDL1依存性ユビキチン化

NEDL1は、SOD1変異体をSOD1のタイプに依存する様式でユビキチン化した。COS7細胞を図5に示した発現プラスミドを用いて、一過的に共トランスフェクトした。トランスフェクトしたCOS7細胞からの全細胞溶解物を抗Myc抗体で免疫沈降させて、抗ユビキチン抗体を用いて免疫プロットした(上部パネル)。ユビキチン化の程度は、ほぼFALSの臨床重症度(A4V>G93A>H46R)に比例した。全細胞溶解物を抗NEDL1抗体で免疫プロットし、トランスフェクトしたNEDL1の発現を確認した(下部パネル)。図中、矢印は、ユビキチン化されていないSOD1の位置を示し、左側に分子量マーカーの位置を示してある。

[0051] (実施例5) NEDL1の存在下、または不在下の野生型SOD1およびSOD1変異体の半減期

シクロヘキシジンを添加後(終濃度50  $\mu$  g/ml)、図6に示したような異なる時点で回収した、空ベクターまたはNEDL1発現プラスミドでトランスフェクトしたNeuro2a細胞の溶解物を抗FLAG抗体で免疫プロットして、SOD1蛋白レベルを分析した。SOD1変異体は、野生型SOD1より迅速に分解された。NEDL1は、野生型SOD1の分解に影響を及ぼさなかった。SOD1変異体タンパク質の分解は、促進され、NEDL1の存在下、SOD1変異体タンパク質の半減期は、ほぼFALSの重症度(A4V>G93A>H46R)に比例して減少してゆくことが分かる。

[0052] (実施例6) NEDL1とDvl1との結合

COS7細胞中、MycタグDvl1をNEDL1とともに過剰発現させた。全細胞溶解物を抗NEDL1抗体で免疫沈降させ、続いて抗Myc抗体を用いて免疫プロットした(図8の上部パネル)。MycタグDvl1の発現レベルを抗Myc抗体を用いて、免疫プロットし解析した(下部パネル)

[0053] (実施例7) Dvl1のNEDL1依存性ユビキチン化

NEDL1は、COS7細胞中Dvl1をユビキチン化した。COS7細胞を図9に示した発現プラスミドを用いて、一過的に共トランスフェクトした。トランスフェクトしたCOS7細胞からの全細胞溶解物を抗Myc抗体で免疫沈降させて、抗ユビキチン抗体を用いて免疫プロットした(上部パネル)。全細胞溶解物を抗xpress-NEDL1抗体(中段パネル)または抗Myc抗体(下段パネル)で免疫プロットし、トランスフェクトしたNEDL1または

Myc-Dvl1の発現を確認した。

[0054] (実施例8) NEDL1によるDvl1の分解

Neuro2a細胞をFLAGタグDvl1用の発現プラスミドを用いて、NEDL1発現プラスミドの存在下、または不在のもとでトランスフェクトした。トランスフェクト細胞をシクロヘキシジン添加後(終濃度50  $\mu$ g/ml)、図10に示したような異なる時点で回収した。

Neuro2a細胞溶解物を抗FLAG抗体で免疫プロットして、Dvl1蛋白レベルを分析した。NEDL1の存在下、FLAG-Dvl1の半減期は、顕著に減少した。

[0055] (実施例9) Dvl1とSOD1変異体との結合

COS7細胞を図11に示した発現プラスミドで一過的に共トランスフェクトした。全細胞溶解物を抗Myc抗体で、免疫沈降させ、それから抗FLAG抗体または抗Myc抗体を用いて、免疫プロットした。NEDL1の存在下、Dvl1とSOD1変異体との結合が強まっていることが分かる(図11、レーン4)。結合能は、ほぼFALSの重症度(A4V>G93A>H46R)に比例して減少してゆくことも分かる。

### 産業上の利用可能性

[0056] 以上説明したように、本発明は、NEDL1とSOD1変異体との結合能、或いはNEDL1存在下、または非存在下でのNEDL1関連因子とSOD1変異体との結合能を評価することによって、前記SOD1変異体が単離されたFALS患者の臨床悪性度の判定を可能にし、FALSの診断に役に立つ。

## 請求の範囲

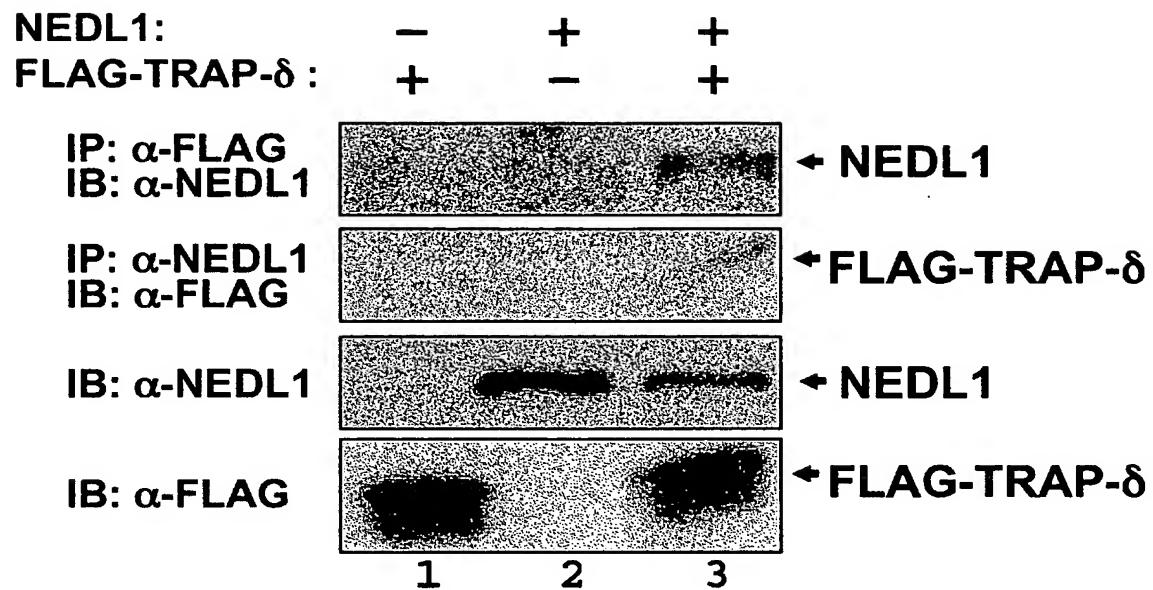
- [1] FALS患者由来の被検体からSOD1変異体を単離し、該SOD1変異体とTRAP  $\delta$ との結合能を評価することを特徴とする、FALSの臨床悪性度の判定方法。
- [2] FALS患者由来の被検体からSOD1変異体を単離し、該SOD1変異体とNEDL1およびDvl1との結合能を評価することを特徴とする、FALSの臨床悪性度の判定方法。
- [3] FALS患者由来の被検体からSOD1変異体を単離し、該SOD1変異体とNEDL1との結合能を評価することを特徴とする、FALSの臨床悪性度の判定方法。
- [4] FALSの臨床悪性度の判定におけるNEDL1またはその基質の使用。
- [5] 単離SOD1変異体を用いることを特徴とする請求項4に記載のNEDL1の使用。
- [6] 前記基質がTRAP  $\delta$  またはDvl1であることを特徴とする請求項5に記載のNEDL1の使用。
- [7] SOD1変異体とNEDL1および／またはその基質との相互作用における阻害剤。
- [8] 前記基質がTRAP  $\delta$  またはDvl1であることを特徴とする請求項7に記載の阻害剤。
- [9] 神経細胞において、候補薬剤がSOD変異体とNEDL1および／またはその基質との相互作用における阻害剤であるか否かを決定することを特徴とする、FALSの治療において有用な薬剤をスクリーニングする方法。

[図1]

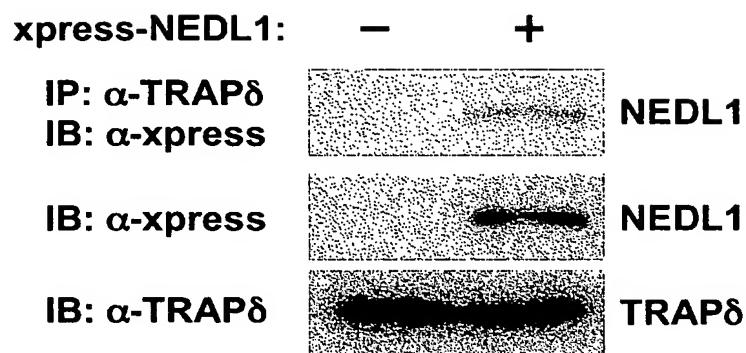
hNEDL1	MASPSRNSQSRRCKEPLRYSYNPDQFHMDLRCGPHDGVTIPRSTSOTDVLTSRSRSTLIVSSSYSI	GHSQLVIIHDIKEEVDAQDWIGMYLIDEVL	100
hNEDL1	MASPSRNSQSRRCKEPLRYSYNPDQFHMDLRCGPHDGVTIPRSTSOTDVLTSRSRSTLIVSSSYSI	GHSQLVIIHDIKEEVDAQDWIGMYLIGEV	100
hNEDL1	SENFLDYKNGVNGSHRGQIWKIDASSYFVEPETKICFKYYHGVSALRATTPSVTKNSAAPIFKSIGADETVQGQGSRRLISFSLSDFOAMGLKKGM	200	
hNEDL1	SENFLDYKNGVNGSHRGQIWKIDASSYFVESETKICFKYYHGVSALRATTPSVTKNSAAPIFKGIGSEETAQSOGSRRLISFSLSDFOAMGLKKGM	200	
hNEDL1	FFNPDPYVLSIOPGKHSIPEALPHIGERRSKIGNTVPLIWAEOFSEVSLPOTVLEFVKDKFAKSRPTIKRFGLKSMVPRVRLERIAIGORVSY	300	
hNEDL1	FFNPDPYVLSIOPGKHSIPEALPHIGERRSKIGNTVPLIWAEOFSEVSLPOTVLEFVKDKFAKSRPTIKRFGLKSMVPRVRLERIAIGORVSY	300	
<b>C2 Domain</b>			
hNEDL1	TLGRRLPTDHVSQLQFRFEITSSIHIPDDEIISLSTEPS-AQIQDSPMNLNIESGSGEPRSEAPESSESIMPQELEGGSVPDRGNOSIELSRPAEEAA	399	
hNEDL1	TLGRRLPTDHVSQLQFRFEITSSIHADDEIISLAEPPSAETQDSIMNSVGNSNCEPSGOATEFCKDAKPESPSEGNGVNSSENQEHAGPVEEAA	400	
hNEDL1	V1TEAGDQGMVSVPGEGAGELLAQVQKDQAPSAEELAEQLDLGEEASALLLEDGEAPASTKEEPLEEATTQSRAGREEEEKEQEEEGDVSTLEQGEG	499	
hNEDL1	GAMIEARDGSNIVSEAPEEPGELQDPEQHDTPQTLAEEVEAGLPLDEDPSSLLPEENTALGSKVEETVPGNGAREEMQKGKDEEEEEEEDVSTLEQGEG	499	
hNEDL1	RLQLRASVKRKSRPCSLPVELETIVASACGDPETPRTHYIRIHTLLHSMPSAQGSAEEEDGAEEESTLKDSEKDGLSEVDTVAADPSALEEDREEP	599	
hNEDL1	-----PELETIVASACGDAETPRTHYIRIHTLLHSMPSAQRGSTTEEDGLEESTLKDSEKDGLSEVDTIAADPQSMEDGESDG	580	
hNEDL1	EGATPGTAHPGHSGGHFPSSLANGAAQDGDTHTSGSESDSSPRQGGDHSCEGCDASCCSPSCYSSCYSTSCYSSCYSASCYSPSCYNGNRFASHTRFS	699	
hNEDL1	ATLCMAPSDCSGGHFFSSLKGIGAGQDGEAHGSTGSESQDSPQQGADHSCCEGCDASCCSPSCYSTSCYSSCYSSSCYNS---GNNRFASHTRFS	676	
hNEDL1	SVDSAKIESTVFSQDDEEEENSAFESVPDMSQSPELDPESTNGAGPQDELAAPSGHVERSPEGLSPVAGPSNRREGECPILHNSQPVSQLPSLRPE	799	
hNEDL1	SVDSAKIESTVFSQDDEEEENSAFESVPDMSQSPELDPESTNGAGPQDELAAPGNAARSTEGLESPNAGPSNRREGECPILHNSQPVSQLPSLRPE	776	
hNEDL1	HHHYPTIOPELPPNWEARIOSHGRVFTVVDHVNRRTTWRQRTAATPDGMRSGSIQOMEQLNRRYQNIQRTIATERSEEDSGSQSCQAP-AGGGGGGGS	898	
hNEDL1	HHHYPTIOPELPPNWEARIOSHGRVFTVVDHNRRTTWRQSPMSQTPDGMIRSGSVHQMEQLNRRYQNIQRTMATERAEEDSGNQNSEQIPDGGGGGGGS	876	
<b>WW Domain 1</b>			
hNEDL1	DSEAEQSSQSSLRREGSLSPVNSQKITLLLQSPAVKFITNPEFFTTLVHANYSAYRVFTSSTCLKHMLVKRRDARNERYQHNRDLVNFINNFADTRLE	998	
hNEDL1	DSEAEQSSQSSLRREGSLSPVNSQVTLQSPAVKFITNPEFFTTLVHANYSAYRVFTSSTCLKHMLVKRRDARNERYQHNRDLVNFINNFADTRLE	976	
hNEDL1	LPRGWEIKTDOQQKSFVDHNSRATTFTDPRIPLQNGRLPNHLTHQHLQRLRSYAGEASEEVSRNRGASLLARPGLVAAIRSQHQHESLPLAYNDKI	1098	
hNEDL1	LPRGWEIKTDOQQKSFVGHNSRATTFTDPRIPLQNGRLPNHLTHQHLQRLRSYAGEASEEVSRNRGASLLARPGLVAAIRSQHQHESLPLAYNDKI	1076	
<b>WW Domain 2</b>			
hNEDL1	VAFLRQPNIFENLQEROPSLARHHTLREKIHYIRTEGHNGLEKLSQADLVIILSLFEEIMSYVPLQAFHPGYSFSPRCSPCSPQNSPGLQRASARA	1198	
hNEDL1	VAFLRQPNIFENLQEROPSLARHHTLREKIHYIRTEGHNGLEKLSQADLVIILSLFEEIMSYVPLQAFHPGYSFSPRCSPCSPQNSPGLQRASARA	1176	
hNEDL1	PSPYRRDFEAKLRFNRYKLEAKCFGQGPCKIKLIRRDLLEGTFTNQVMAYSRKELQRNKLYTVFGEEGLDYSGPSREFFFLSQELFNPPYGLFEYSA	1298	
hNEDL1	PSPYRRDFEAKLRFNRYKLEAKFGQGPCKVKLIRRDLLEGTFTNQVMAYSRKELQRNKLYTVFGEEGLDYSGPSREFFFLSQELFNPPYGLFEYSA	1276	
hNEDL1	NDTYTVQISPMASFENHLEWFRFSGRLGLALIHQYLLDAFFTRPFYKALLRLPCDLSOLEYDEEFHQSLQHNDNNITDILDLTFTVNEEVFGQVTE	1398	
hNEDL1	NDTYTVQISPMASFENHLEWFRFSGRLGLALIHQYLPDAFFTRPFYKGLLKLPCDLSOLEYDEEFHQSLQHNDNNITDILDLTFTVNEEVFGQVTE	1376	
hNEDL1	RELKSGGANTQTEKKNKEYIERMKWIRVERGVQQTEALVRGFYEVVDSRLVSVFDARELELVIACTAEIDLNDWNNTEYRGYVHDGLVIRWFWAAV	1498	
hNEDL1	RELKSGGANTQTEKKNKEYIERMKWIRVERGVQQTEALLRGFYEVVDSRLVSVFDARELELVIACTAEIDLNDWNNTEYRGYVHDGLVIRWFWAAV	1476	
hNEDL1	ERFNNEQRLLRLLQFVTGSSVVPYEGFAALRGSGNLRFCIEKWKITSLPRAHTCFNRLDLPVPSYSMLYEKLTTAVEETSTFGLER	1585	
hNEDL1	ERFNNEQRLLRLLQFVTGSSVVPYEGFAALRGSGNLRFCIEKWKITSLPRAHTCFNRLDLPVPSYSMLYEKLTTAVEETSTFGLER	1563	

**HECT Domain**

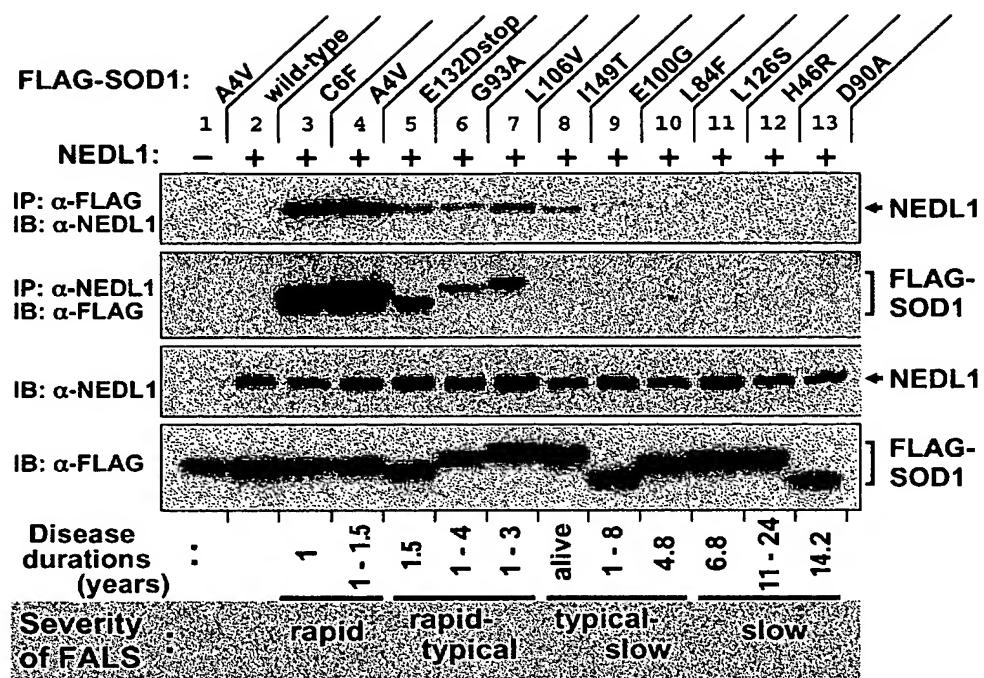
[図2]



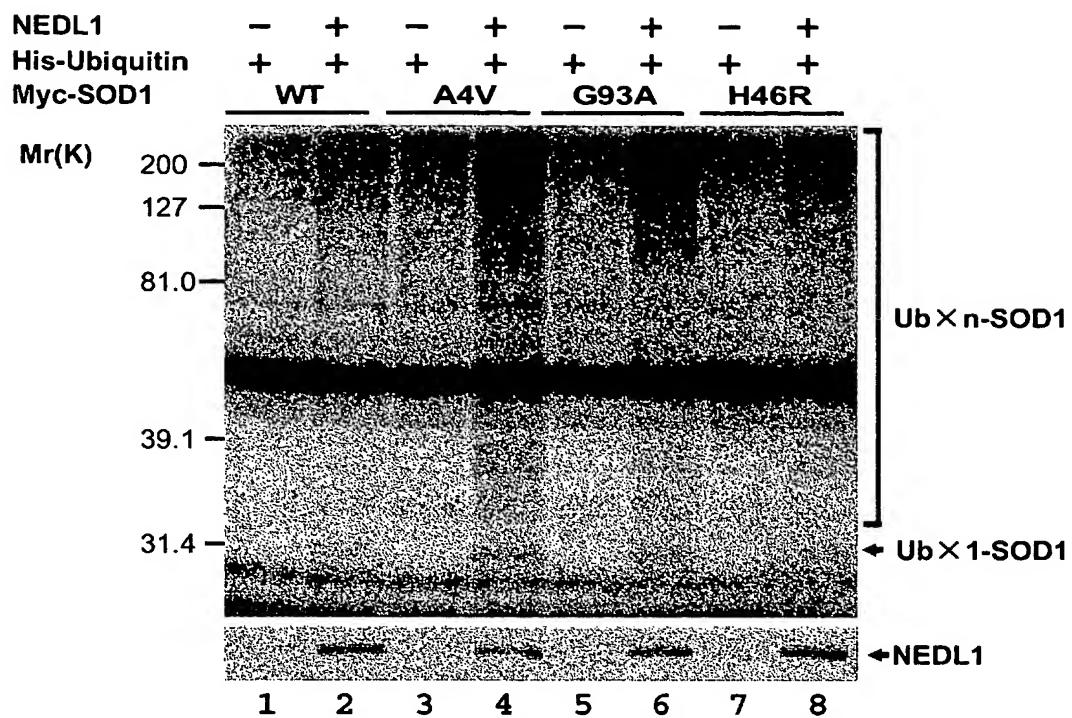
[図3]



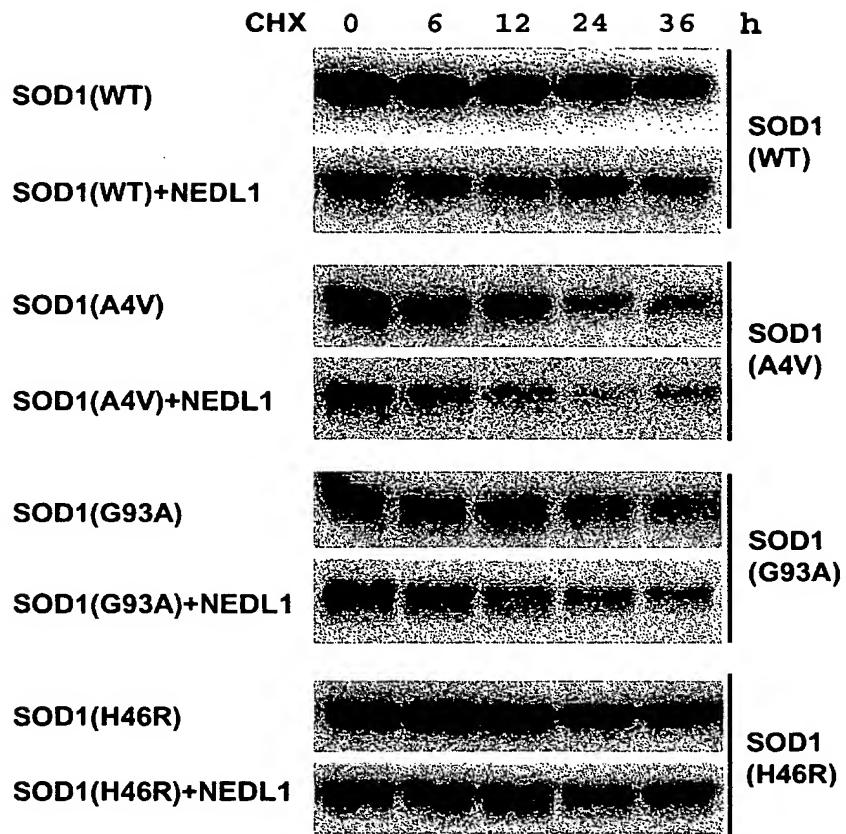
[図4]



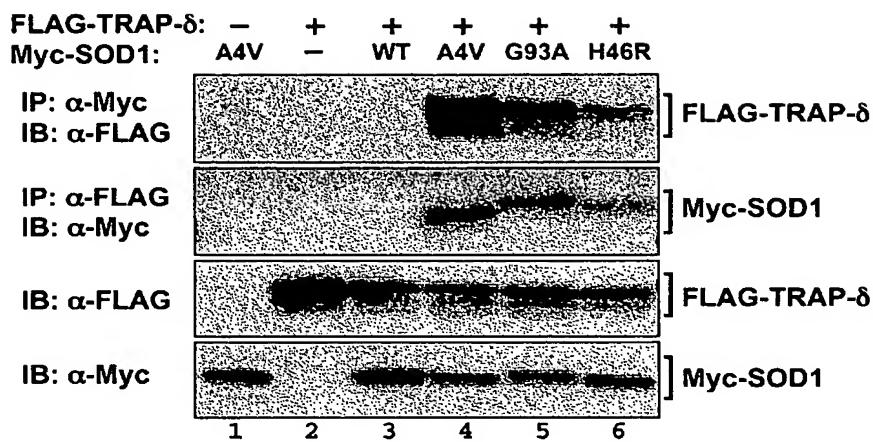
[図5]



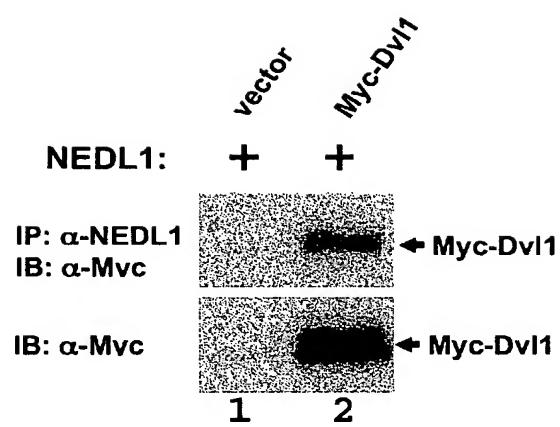
[図6]



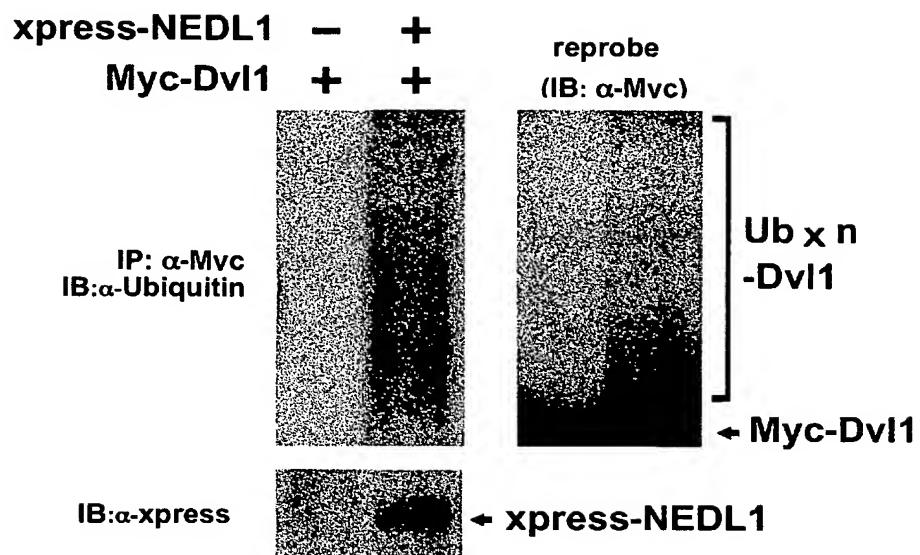
[図7]



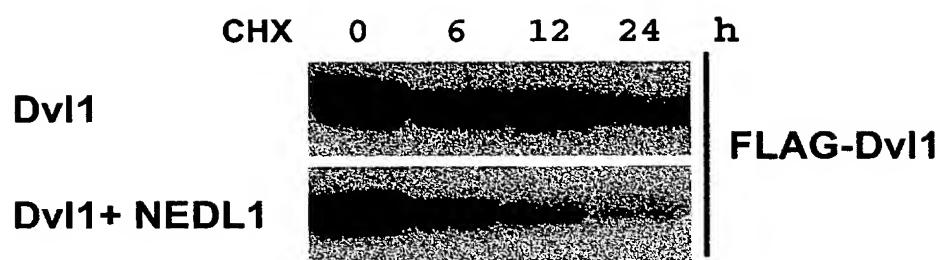
[図8]



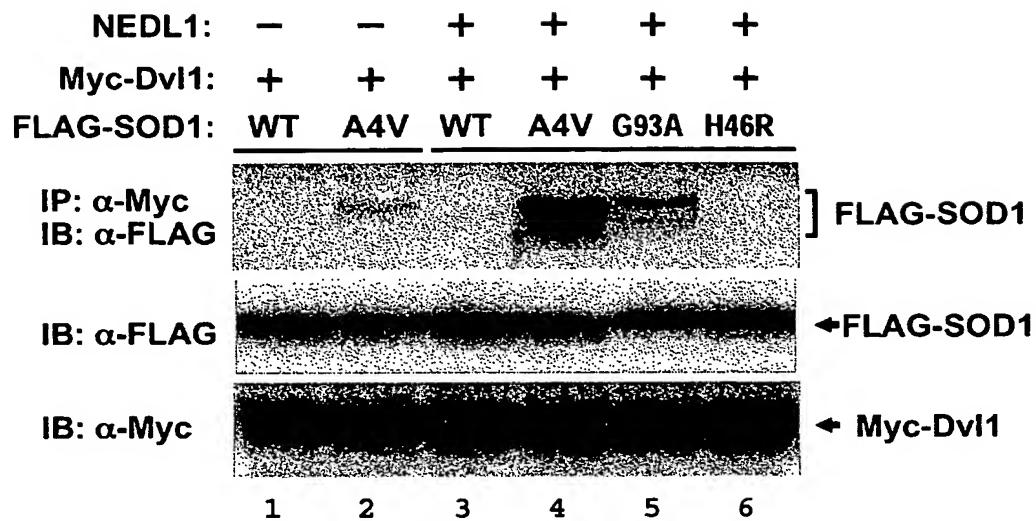
[図9]



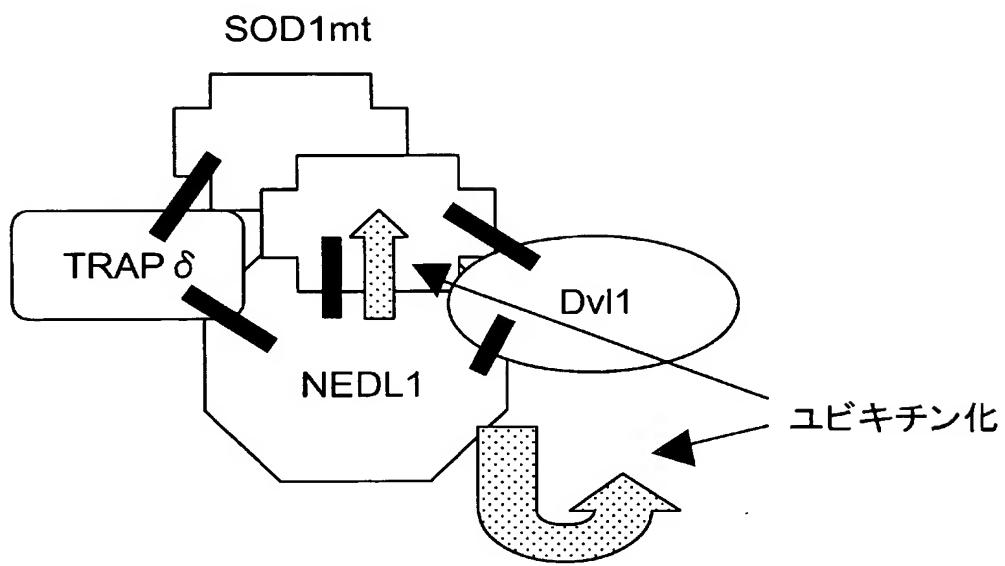
[図10]



[図11]



[図12]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP2004/018410A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>7</sup> C12Q1/26, C12N9/99, C12N15/09, G01N33/15, G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>7</sup> C12Q1/26, C12N9/99, C12N15/09, G01N33/15, G01N33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
SwissProt/PIR/Geneseq, GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq,  
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS), MEDLINE (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Kunst, C.B. et al., Mutations in SOD1 associated with amyotrophic lateral sclerosis cause novel protein interactions. Nature Genetics, Vol.15(1), pages 91 to 94 (1997)	1, 4, 9 6
Y	NIWA, J. et al., Dorfin ubiquitylates mutant SOD1 and prevents mutant SOD1-mediated neurotoxicity. J.Biol.Chem., Vol.277(39), pages 36793 to 36798 (2002)	3, 4, 5, 6, 9
Y	JP 2003-135063 A (Chiba-Ken), 13 May, 2003 (13.05.03), & WO 03/018842 A1 & EP 1428891 A1	3, 4, 5, 6, 9

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
04 February, 2005 (04.02.05)Date of mailing of the international search report  
22 February, 2005 (22.02.05)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**International application No.  
PCT/JP2004/018410**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.: 7, 8  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
Although the inhibitors as set forth in claims 7 and 8 involve any substances inhibiting the interactions between a mutant SOD1 and NEDL1 and/or its substrate (TRAPδ or Dvl1), no substance having this function is specifically and comprehensively presented in the description. (continued to extra sheet)
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

As reported in the following documents 1 and 2, it had been publicly known before the present application that familial ALS (FALS) is caused by a gene mutation in superoxide dismutase (SOD1) and the SOD1 mutant can be specifically detected by using ubiquitin ligase (Dorfin) or TRAPδ. Thus, it cannot be considered as a special technical feature in the meaning within PCT Rule 13.2 to diagnose FALS by using a mutant SOD1 as an indication.

Therefore, the inventions based on the ability of the mutant SOD1 to bind to TRAPδ, the inventions based on the ability of the mutant SOD1 to bind NEDL1 and the inventions based on the ability of the mutant SOD1 to bind to Dvl1 cannot be considered as a group of inventions (continued to extra sheet)

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/018410

Continuation of Box No.II-2 of continuation of first sheet(2)

Thus, the inventions relating to the whole inhibitors are not supported by the description and the above claims are described in an extremely unclear manner.

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

so linked as to form a single general inventive concept and it is recognized that claims of the present case has three groups of inventions.

Document 1: Nature Genetics, Vol.15(1), pp.91-94 (1997)

Document 2: J. Biol. Chem., Vol.277, No.39, pp.36793-36798 (2002)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int.Cl' C12Q1/26, C12N9/99, C12N15/09, G01N33/15, G01N33/50

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
Int.Cl' C12Q1/26, C12N9/99, C12N15/09, G01N33/15, G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
SwissProt/PIR/GenSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GenSeq,  
WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), JSTplus(JOIS), MEDLINE(STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	Kunst, C. B. et al., Mutations in SOD1 associated with amyotrophic lateral sclerosis cause novel protein interactions. Nature Genetics, Vol. 15(1) pp. 91-94 (1997)	1, 4, 9 6
Y	Niwa, J. et al., Dorfin ubiquitylates mutant SOD1 and prevents mutant SOD1- mediated neurotoxicity. J. Biol. Chem., Vol. 277(39) pp. 36793-36798 (2002)	3, 4, 5, 6, 9

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示す  
もの  
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日  
以後に公表されたもの  
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行  
日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する  
文献 (理由を付す)  
「O」口頭による開示、使用、展示等に旨及する文献  
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって  
出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論  
の理解のために引用するもの  
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明  
の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以  
上の文献との、当業者にとって自明である組合せに  
よって進歩性がないと考えられるもの  
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

0.4. 02. 2005

国際調査報告の発送日

22. 2. 2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 明照

4N

8412

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
Y	JP 2003-135063 A (千葉県) 2003. 05. 13 & WO 03/018842 A1 & EP 1428891 A1	3, 4, 5, 6, 9

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2.  請求の範囲 7, 8 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をできる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、  
請求の範囲 7、8に記載の阻害剤は、SOD1変異体とNEDL1および/またはその基質 (TRAP $\delta$ 、Dv11) との相互作用を阻害するあらゆる物質を包含するものであるが、明細書には、このような機能を有する物質が具体的かつ網羅的に記載されていないから、当該阻害剤全般に係る発明は明細書による裏付けを欠き、かつ前記請求の範囲の記載は著しく不明瞭である。
3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

下記文献1、2にも記載されているように、家族性ALS (FALS) の原因がスーパーオキシドジズムターゼ (SOD1) の遺伝子変異であって、ユビキチンリガーゼ (Dorfin) やTRAP $\delta$ を用いて当該SOD1変異体を特異的に検出することは出願前公知であるから、SOD1変異体を指標にFALSの診断を行うことはPCT規則13.2における特別な技術的特徴であるとはいえない。

したがって、SOD1変異体とTRAP $\delta$ との結合能に基づく発明、SOD1変異体とNEDL1との結合能に基づく発明、SOD1変異体とDv11との結合能に基づく発明は、単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとはいはず、本願の請求の範囲には3個の発明が記載されているものと認められる。

文献1 : Nature Genetics, Vol. 15(1), pp. 91-94 (1997)

文献2 : J. Biol. Chem., Vol. 277, No. 39, pp. 36793-36798 (2002)

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。